

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 12/05/2019.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**CRISTIANE MAYUMI INAGATI**

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ DA DENTINA**  
**BOVINA E HUMANA**

**Araraquara**

**2017**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**CRISTIANE MAYUMI INAGATI**

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ DA DENTINA**  
**BOVINA E HUMANA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

**Orientadora:** Profa. Dra. Josimeri Hebling

**Araraquara**

**2017**

Inagati, Cristiane Mayumi

Atividade proteolítica e degradação da matriz da dentina bovina e humana / Cristiane Mayumi Inagati. -- Araraquara: [s.n.], 2017  
78 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Dentina 2. Metaloproteases 3. Hidroxiprolina I. Título

**CRISTIANE MAYUMI INAGATI**

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ DA DENTINA  
BOVINA E HUMANA**

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

**Comissão julgadora**

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

2º Examinador: Prof. Dra. Mariane Emi Sanabe

3º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Araraquara, 12 de maio de 2017

## **DADOS CURRICULARES**

**CRISTIANE MAYUMI INAGATI**

NASCIMENTO: 17/08/1987, Apucarana - PR

FILIAÇÃO: Eva Sizuka Inagati  
Carlos Inagati

2009/2014: Curso de Graduação em Odontologia  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

2015/2017: Curso de Pós-graduação em Reabilitação Oral  
Nível: mestrado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp

# *DEDICATÓRIA*

*“A Grande Conquista é o resultado de pequenas vitórias que passam despercebidas.”*

*Paulo Coelho*

Em primeiro lugar, dedico a **Deus**, por sempre me acompanhar nas horas boas e ruins. Acredito que sem a presença Dele iluminando todos os meus passos não teria alcançado todas as minhas realizações e conquistas. Para Deus nada é impossível.

À Maria, mãe do nosso Senhor, pela força que me dá a cada dia para que eu continue lutando, em meio a tantas dificuldades, e por me permitir levantar todos os dias para um novo recomeço de cada dia.

Ao meu pai, **Carlos Inagati** (*in memoriam*)...não há palavras para descrever o amor que eu sempre sentirei pelo senhor. Dizer um simples muito obrigada é pouco por tudo que o senhor fez por mim. Obrigada pela família maravilhosa que construímos, por todo o seu amor e principalmente por sempre me incentivar a estudar diariamente e nunca desistir dos meus sonhos e objetivos.

À minha mãe, **Eva Inagati**...não há palavras para te agradecer por tudo que você fez e faz por mim até hoje. Obrigada por ser uma mãe exemplar, por ter me concedido uma educação de excelência, sobretudo por ser guerreira em dar

continuidade naquilo que foi deixado pelo meu pai e por cuidar da nossa família tão bem. Sem a sua força e confiança não poderia ter chegado tão longe.

Ao meu irmão, **Alex**, que mesmo com todas as nossas diferenças sempre permanecemos unidos.

Aos meus avós maternos, **Tshumoru** (*in memorian*) e **Nakako Yamada** (*in memorian*), mesmo distantes sei que sempre torceram e torcem por mim.

Os meus tios, **Teresa e Paulo**, apesar da distância, sempre estão presentes na minha e na vida da minha família, nos ajudando e torcendo para que tudo ocorra como o planejado.

Aos meus primos **Augusto, Silvana, Marisa, Osvaldo, Eliza, Hélio, Meire, Edna, Marcia e Sadao** agradeço por sempre torcerem por mim e por estarem presentes na minha vida. Saibam que tenho imensa alegria de ter vocês como parte da minha família.

Aos meus amigos que me dão o conforto, palavras de amizade sincera e força para eu continuar batalhando por aquilo que eu acredito, fica aqui a minha singela homenagem.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu alcançasse os meus sonhos e objetivos finais saibam que estão guardados em meu coração.



# ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

*“É nos momentos difíceis que encontramos os verdadeiros amigos.”*

***Clarice Lispector***

Gostaria primeiramente de agradecer a minha querida orientadora, **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, professora do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp. Agradeço por todo o seu carinho, auxílio, dedicação, paciência e, sobretudo, por me passar um pouco do seu amplo conhecimento. Agradeço também por todo o seu acolhimento e confiança depositada em meu trabalho mesmo sem me conhecer. Foi uma experiência difícil, mas muito gratificante. Apesar da distância durante o primeiro ano do meu mestrado, a senhora sempre esteve disposta a me ajudar, me dando todo o suporte necessário para que eu desenvolvesse a minha pesquisa. Para mim foi um imenso prazer ter tido a oportunidade de trabalhar com uma pesquisadora e pessoa tão maravilhosa quanto a senhora. Muito obrigada.

À **Profa. Dra. Débora Scheffel**, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp. Muito obrigada por sua amizade, conversas, conselhos e por sempre estar disposta a me ajudar em tudo que necessitei durante o mestrado. Acredito que sem os seus conhecimentos e o seu incentivo não teria realizado a minha pesquisa. Você é uma inspiração para mim e dizer um simples obrigado é pouco por tudo que você fez e faz por mim. Sucesso sempre.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp. Agradeço por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório durante a ausência da minha orientadora, pelo seu apoio e contribuição para a realização deste projeto.

Um professor que não posso esquecer de agradecer pela sua calma e tranquilidade que transmite a todos os seus alunos, **Prof. Dr. Gelson Luis Adabo**, professor do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Meus sinceros agradecimentos por transmitir a mim todo o seu conhecimento e sua experiência durante esses dois anos. Tenho a certeza que sou uma pessoa melhor com todo o conhecimento que o senhor me transmitiu.

À **Profa. Dra. Ligia Antunes Pereira Pinelli**, professora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Professora, agradeço por sua orientação no estágio docência na disciplina de prótese fixa e sobre implantes I e II, sobretudo pela sua amizade durante os dois anos de convívio. Suas palavras, seus conselhos e suas críticas construtivas durante esses anos me fizeram crescer a cada dia.

Ao **Prof. Dr. José Mauricio dos Reis**, professor do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Obrigada por todo o seu conhecimento que foi transmitido a mim, pelo clínico que o senhor é, pela sua amizade e sua humildade meus sinceros agradecimentos. Se um dia eu obter 10 por cento dos seus conhecimentos clínicos eu estarei imensamente feliz.

À **Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca**, professora do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese. Meus sinceros agradecimentos pela calma e tranquilidade que me transmitiu durante o meu exame de qualificação com todo o seu conhecimento, dedicação e contribuição para enriquecer ainda mais o meu trabalho.

À **Dra. Giovana Anovazzi Medeiros**, aluna de pós-doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Giovana, faz poucos meses que nos conhecemos, mas parece que já convivemos há anos. Apesar de pouco tempo, você tem me ajudado muito nesses últimos meses, me aconselhando e sempre se oferecendo para ajudar. Você é uma pessoa muito especial, espero continuar trabalhando com você. Muito obrigada por tudo.

Às minhas amigas, **Bruna Cristina de Souza, Carla Barbosa e Rosângela Viegas**. Vocês, para mim, além de amigas são como minhas irmãs. Com vocês eu aprendi o poder da amizade sincera e sei que posso contar sempre com cada uma para eu desabafar quando necessitar. Obrigada por me ouvirem sempre. Dizer um muito obrigada é pouco para vocês que sempre torceram por mim. Valeu meninas que a nossa amizade perdure para o resto das nossas vidas.

Às minhas amigas **Fabielle, Patricia, Luciana, Aline, Gabriela, Luana, Mariany, Simoni e Karla**. Sou grata por nossa amizade que começou num pensionato de freiras há quase 10 anos. Morei com cada uma em épocas diferentes, mas todas vocês são muito especiais para mim. Morar com vocês foi incrível, lá nascia uma linda amizade, que mesmo com a distância, perdura até os dias de hoje. Muito obrigada por tudo “girls”.

Aos meus amigos, **Willian, Aneliza, Adriana, Ana Márcia, Luciene, Andressa, Flávia, Camila Terra, Camila Rafaela, Esdras, Nádia, Kezia e Fabiola.** Amigos que ganhei durante a minha graduação. Apesar da distância sempre os tenho em meu coração. Obrigada sempre pela torcida e confiança.

Ao **Dr. Marcos Guskuma e toda a sua equipe** por todos os seus ensinamentos durante o período em que estive em sua clínica como estagiária e hoje posso agradecer pela amizade e carinho.

Às minhas amigas, **Midian, Natali e Uxua**, muito obrigada pela amizade sincera. Sinto que vocês foram o meu maior presente desses dois anos. Admiro cada uma de vocês pelo o que são. Aprendi um pouco com cada uma e fico muito agradecida, sobretudo, pela força que vocês transmitem a mim. Vocês são os amigos que conquistei durante o mestrado.

À minha amiga e colega de laboratório **Cláudia Huck**, minha eterna gratidão pela sua amizade, paciência e pelo seu convívio diário nesses dois anos. Levarei você sempre comigo.

Às minhas amigas de laboratório, **Carla, Ana Paula, Juliana, Leopoldina, Fernanda, Diana, Taisa, Suelen, Maria Luisa, Ester, Mariana e Lais** pelo o convívio do dia a dia e por todo o suporte que vocês me deram durante o mestrado.

A todos os alunos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais muito obrigada pela convivência e pelo o aprendizado que me foram transmitidos.

Aos meus amigos do mestrado, **Stephania, Lucas, Guilherme Rocha, Guilherme Braido, Vinicius, Gabriela, Bruna, Larissa, Priscila, Jacqueline e Elkin**, pela batalha de cada dia.

# *AGRADECIMENTOS*

*“Por mais simples que seja, um riso autêntico inscreve  
um agradecimento aos nossos olhos.”*

*Marcel Franco*

À **Universidade Estadual Paulista - “Julio de Mesquita Filho”**, em nome do atual magnífico reitor **Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini** e do vice-reitor **Prof. Dr. Sergio Roberto Nobre**. Agradeço por fazer parte dessa universidade que me fez crescer pessoalmente e, principalmente, profissionalmente.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, nas pessoas da atual diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato** e seu vice-diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, por ter me acolhido nesta Instituição de Ensino.

Ao **Laboratório de Pesquisas e Análises de Biomateriais**, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, sob a coordenação da **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, onde foi desenvolvida grande parte desta pesquisa.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais**, sob a coordenação do **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, pelo apoio financeiro e de infraestrutura para esta pesquisa.

Ao **Departamento de Fisiologia e Patologia**, nas pessoas do atual chefe de departamento, **Prof. Dr. Eduardo Colombari** e seu vice-chefe **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**.

Ao **Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral**, aqui representado pela atual coordenadora **Prof. Dra. Ana Cláudia Pavarina** e vice-coordenadora **Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca**, pela confiança depositada no meu potencial, meus sinceros agradecimentos.

Ao **Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, nas pessoas do atual chefe de departamento **Prof. Dr. Gelson Luis Adabo** e seu vice-chefe **Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho**. Meus sinceros agradecimentos por terem permitido o meu crescimento profissional, pelos conhecimentos compartilhados por todos os professores nas disciplinas cursadas e nos estágios docência durante o mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado, concedida no período de dezembro/ 2015 a março/ 2017.

À **Sonia Maria Tircallo**, secretária do Departamento de Clínica Infantil. Muito obrigada por toda a atenção e por sempre estar disposta a solucionar os problemas quando estes apareceram.

A todos os professores do programa de Reabilitação Oral por todo o conhecimento e dedicação em transmitir o que sabem, minha singela homenagem.

A todos os funcionários da faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo convívio e carinho com os quais desenvolvem seus trabalhos, deixando o ambiente mais agradável, e também pela atenção que cada um teve por mim.

A todos os professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina (UEL) meus sinceros agradecimentos. Eu não teria chegado tão longe se vocês não tivessem me dado tantas oportunidades, conselhos, prestatividade, amizade e carinho durante a minha graduação.

A todos os orientados da clínica de Prótese Fixa meu muito obrigada por todos os ensinamentos e pela amizade sincera de cada um. Vocês foram o meu maior presente e foi um enorme prazer ter compartilhado um pouco do que aprendi com vocês.

Por fim agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha história, sempre torcendo e vibrando pelo o meu sucesso profissional e pessoal, minha singela homenagem.



***“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que  
as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia  
impossível.***

(Charles Chaplin)

Inagati CM. Atividade proteolítica e degradação da matriz da dentina bovina e humana [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

## **RESUMO**

Dentes bovinos têm sido utilizados como substitutos aos dentes humanos, especialmente em pesquisas sobre adesão. Entretanto, ainda não foi demonstrada se a degradação do colágeno de ambos os substratos ocorre na mesma intensidade/velocidade. Portanto, esse estudo comparou a atividade de metaloproteinases da matriz (MMPs) e a degradação da matriz dentinária de dentes bovinos versus humanos. A coroa de dentes humanos e bovinos foram seccionadas para a obtenção de espécimes de dentina (0,5x1,0x4,0 mm). Todos os espécimes (n=30/tipo de dente) foram completamente desmineralizados em ácido fosfórico. Quinze espécimes foram aleatoriamente selecionados para a análise da atividade total de MMPs por método colorimétrico, e os restantes foram utilizados para a análise de perda de massa seca em balança microanalítica. Concluídas as análises iniciais, os espécimes foram armazenados em saliva e as análises, perda de massa seca e MMPs, foram repetidas após 7, 14 e 21 dias. Em cada período, a saliva foi coletada para a análise da liberação de hidroxiprolina por meio de teste colorimétrico. Os dados foram submetidos aos testes de Friedman, Wilcoxon para medidas repetidas e Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). A atividade inicial de MMPs foi similar dentre os dois substratos, com redução significativa em função do tempo, especialmente após 7 dias de armazenamento. Aos 7, 14 e 21 dias de análise, a atividade de MMPs foi mais intensa para a dentina bovina. Aos 7 dias houve elevada liberação de hidroxiprolina para ambos os substratos, sendo que maiores valores foram encontrados para a dentina bovina. Aumento da perda de massa seca também foi observado em função do tempo. Entretanto, diferença significativa entre os dois substratos foi detectada apenas aos 21 dias. Em conclusão, embora a velocidade da atividade proteolítica e de liberação de hidroxiprolina tenha sido similar para ambos os substratos, a intensidade desses eventos foi maior para a dentina bovina.

**Palavras-chave:** Dentina. Metaloproteases. Hidroxiprolina.

Inagati CM. Proteolytic activity and matrix degradation of bovine and human dentin [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

## **ABSTRACT**

Bovine teeth have been often used as a substitute for human teeth in studies about enamel and dentin adhesion. However, it has not yet been shown if the degradation of collagen of both substrates occurs at the same intensity and rate. Therefore, this study compared the total activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and the degradation rate of dentin matrix from bovine versus human teeth. The crowns of human and bovine teeth were sectioned to obtain specimens of dentin (0.5x1.0x4.0mm). All specimens (n=30/tooth type) were completely demineralized in phosphoric acid. Fifteen specimens were randomly selected for the total MMPs activity analysis by a colorimetric method, while the remaining specimens were used to determine the loss of dry mass in a microanalytical balance. Once the initial analyses were concluded, the specimens were stored in saliva-like solution, and both analyzes, dry mass and MMPs activity, were repeated after 7, 14 and 21 days. In each period, the saliva was collected to determine the amount of hydroxyproline released by means of a colorimetric assay. The data were submitted to Friedman, repeated-measures Wilcoxon and Mann-Whitney tests ( $p < 0.05$ ). Similar initial MMP activity was seen between the two substrates, with a significant reduction over time, especially after 7 days. At 7, 14 and 21 days, bovine dentin had a higher proteolytic activity. After 7 days, there was a high hydroxyproline release for both substrates, with significantly higher amounts seen for the bovine dentin. Increased dry mass loss was also observed as a function of time. However, a significant difference between both substrates was detected only after 21 days. In conclusion, although the rate of proteolytic activity and hydroxyproline release were similar for both substrates, the intensity of these events were greater for the bovine dentin.

**Keywords:** Dentin. Metalloproteases. Hydroxyproline.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
<b>2.1 Adesão à dentina</b> .....	21
<b>2.2 Degradação da união resina-dentina</b> .....	22
<b>2.3 A dentina humana e suas proteases</b> .....	23
<b>2.4 Características da dentina bovina</b> .....	29
<b>2.5 Dentina bovina vs. humana na odontologia adesiva</b> .....	30
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	33
<b>3.1 Proposição geral</b> .....	33
<b>3.2 Proposições específicas</b> .....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	34
<b>4.1 Organograma do estudo</b> .....	34
<b>4.2 Obtenção dos espécimes de dentina</b> .....	35
<b>4.3 Obtenção das matrizes de colágeno</b> .....	37
<b>4.4 Determinação da atividade total de MMP</b> .....	38
<b>4.5 Equivalência à atividade de MMP-9</b> .....	39
<b>4.6 Determinação da massa seca e das frações constituintes da dentina</b> .	40
<b>4.7 Armazenamento em solução tipo saliva</b> .....	41
<b>4.8 Liberação de hidroxiprolina (HYP)</b> .....	42
<b>4.9 Análise estatística</b> .....	43
<b>5 RESULTADO</b> .....	45
<b>5.1 Composição simplificada da dentina bovina e humana</b> .....	45
<b>5.2 Atividade total de MMPs da dentina bovina e humana</b> .....	45
<b>5.3 Equivalência à MMP-9</b> .....	46
<b>5.4 Perda de massa seca</b> .....	47
<b>5.5 Liberação de hidroxiprolina (HYP)</b> .....	49
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>ANEXO A</b> .....	70
<b>ANEXO B</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

Os procedimentos restauradores adesivos têm se tornado mais eficazes, estéticos e conservadores. Enquanto as primeiras resinas compostas e sistemas adesivos apresentavam baixa resistência de união e reduzida durabilidade (Davidson et al.<sup>20</sup>, 1984; Asmussen et al.<sup>4</sup>, 1985), os materiais contemporâneos apresentam resultados muito mais satisfatórios. Mesmo assim, cerca de 50% dos procedimentos restauradores realizados atualmente, ainda tem por objetivo a substituição ou reparo de restaurações que falharam por diferentes motivos, dentre eles, a degradação da interface adesiva (Gordan et al.<sup>35</sup>, 2012). Essa degradação pode ser inferida clinicamente pela presença de pigmentação marginal, desadaptação marginal, perda parcial ou total da restauração e/ou presença de lesão de cárie associada as margens da restauração (Demarco et al.<sup>22</sup>, 2012).

A união resina-dentina é estabelecida após a desmineralização superficial do tecido dentinário por meio da aplicação de ácido fosfórico, no caso de sistemas adesivos convencionais, ou de monômeros ácidos quando da utilização de sistemas autocondicionantes (Nakabayashi et al.<sup>64</sup>, 1982; Wang, Spencer<sup>116</sup>, 2003; Spencer et al.<sup>97</sup>, 2004; Carvalho et al.<sup>13</sup>, 2005; Anchieta et al.<sup>2</sup>, 2015). A dissolução dos cristais de hidroxiapatita cria espaços para a infiltração do sistema adesivo por entre as fibrilas de colágeno, as quais deveriam ser completamente protegidas por polímeros (Nakabayashi et al.<sup>64</sup>, 1982), preferencialmente hidrófobos e resistentes a degradação hidrolítica mediada por esterases (Tay et al.<sup>103</sup>, 2007; Sadek et al.<sup>82</sup>, 2008; Shin et al.<sup>91</sup>, 2009). Entretanto, em função de tempo, temperatura e pressão comparáveis clinicamente, não é possível a produção de uma camada híbrida livre de imperfeições, e, portanto, essa

estrutura é considerada como sendo a mais frágil da união resina-dentina (Spencer et al.<sup>98</sup>, 2010). Como consequência da infiltração incompleta da zona de dentina desmineralizada, componentes orgânicos da dentina ficam expostos na camada híbrida, favorecendo a degradação (Wang, Spencer<sup>116</sup>, 2003; Spencer et al.<sup>97</sup>, 2004; Carvalho et al.<sup>13</sup>, 2005; Anchieta et al.<sup>2</sup>, 2015; Scheffel et al.<sup>86</sup>, 2016).

O colágeno do tipo I representa 90% do conteúdo orgânico da matriz dentinária, enquanto que proteínas não colagênicas compreendem os restantes 10% (Tjäderhane et al.<sup>108</sup>, 2012). Durante o processo de desmineralização da dentina essas proteínas não colagênicas são expostas juntamente com o colágeno. Dentre essas proteínas, encontram-se as metaloproteinases da matriz (MMPs), proteases residentes no próprio tecido (endopeptidases) capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno em sua forma nativa ou desnaturada. As MMPs têm responsabilidade direta no processo de deterioração da interface adesiva por clivarem as moléculas de colágeno expostas na camada híbrida via inclusão de uma molécula de água (portanto são classificadas como hidrolases) (Pashley et al.<sup>72</sup>, 2011; Mazzoni et al.<sup>60</sup>, 2012; Seseogullari-Dirihan et al.<sup>90</sup>, 2015; Larger et al.<sup>49</sup>, 2016; De Vito Moraes et al.<sup>24</sup>, 2016).

A deterioração da interface adesiva ocorre simultaneamente em duas frentes, (1) a degradação da porção orgânica da camada híbrida (fibrilas de colágeno), que corresponde a aproximadamente 46% do processo (Hu et al.<sup>42</sup>, 2015), e (2) a degradação do componente resinoso da interface, ou seja, a hidrólise dos polímeros instáveis e de natureza hidrófila (De Munck et al.<sup>23</sup>, 2003; Ferrari, Tay<sup>27</sup>, 2003; Wang, Spencer<sup>116</sup>, 2003; Pashley et al.<sup>73</sup>, 2004).

Devido às dificuldades crescentes na obtenção de dentes humanos para pesquisas *in vitro*, muitos estudos têm utilizado a dentina bovina como substrato alternativo em pesquisas sobre adesão (Francisconi et al.<sup>31</sup>, 2008; Li et al.<sup>51</sup>, 2014; Prylinska-Czyzewska et al.<sup>77</sup>, 2015; Li et al.<sup>50</sup>, 2015; Chiba et al.<sup>19</sup>, 2016). No entanto, há restrições quanto a extrapolação dos resultados obtidos com dentina bovina para a dentina humana. Trabalhos que avaliaram as características morfológicas e fisiológicas de ambos os substratos mostraram similaridades entre eles quanto ao número e diâmetro de túbulos presentes na dentina coronária de incisivos bovinos e molares humanos decíduos e permanentes (Schilke et al.<sup>87</sup>, 2000; Soares, Santos<sup>95</sup>, 2015), ao coeficiente de expansão térmica (Lopes et al.<sup>57</sup>, 2012), a resistência de união imediata (Reis et al.<sup>78</sup>, 2004; Soares et al.<sup>93</sup>, 2016), ao desenvolvimento e inibição de lesões cariosas (Hara et al.<sup>37</sup>, 2003; Lippert, Lynch<sup>54</sup>, 2014), erosivas e abrasivas (Young-Laurance et al.<sup>118</sup>, 2011; Wegehaupt et al.<sup>116</sup>, 2008), as propriedades mecânicas (Novais et al.<sup>67</sup>, 2016), a permeabilidade dentinária (Schmalz et al.<sup>88</sup>, 2001) e a composição química (Soares, Santos<sup>94</sup>, 2015; Teruel et al.<sup>104</sup>, 2015). Também foi demonstrado, que tanto MMP-2 como MMP-9 estão presentes em ambos os substratos (Kato et al.<sup>46</sup>, 2011). Entretanto, neste último trabalho, os autores observaram que a atividade de MMP-9 foi equivalente para a dentina humana e bovina, enquanto que a atividade de MMP-2 foi 30% maior para a dentina humana.

A despeito da evidência produzida até o momento, respaldando a utilização de dentes bovinos em diferentes protocolos de pesquisa, não é de conhecimento dos autores da presente dissertação a existência de trabalhos que tenham comparado a taxa (velocidade) e a intensidade da degradação da matriz de dentina de dentes bovinos com a de dentes humanos.

## **7 CONCLUSÃO**

Com base na metodologia aplicada e nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

A velocidade da atividade proteolítica e de liberação de hidroxiprolina foi similar para a dentina humana e bovina. Rápida nos primeiros 7 dias com desaceleração subsequente;

A atividade proteolítica da dentina bovina foi mais intensa do que a da dentina humana em todos os períodos de análise, exceto no período imediato;

Maior degradação foi observada para a dentina bovina em comparação a humana. Entretanto, diferença significativa foi detectada apenas após 21 dias de armazenamento em solução do tipo saliva.



**REFERÊNCIAS\***

1. Almeida KGB, Scheibe KGBA, Oliveira AEF, Alves CMC, Costa JF. Influence of human and bovine substrate on the microleakage of two adhesive systems. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(2): 92-6.
2. Anchieta RB, Machado LS, Martini AP, Santos PH, Giannini M, Janal M, et al. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin- adhesive interfaces. *Dent Mater.* 2015; 31(2):141-53.
3. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, et al. Resin- dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent.* 2004; 29(6): 705-12.
4. Asmussen E, Munksgaard EC. Bonding of restorative resins to dentine promoted by aqueous mixtures of aldehydes and active monomers. *Int Dent J.* 1985; 35(2):160-5.
5. Brackett MG, Tay FR, Brackett MG, Dip A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of an acetone- based dentin adhesives. *Oper Dent.* 2009; 34(4): 381-5.
6. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent.* 2007; 32(2): 107-11.
7. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(3): 207-14.
8. Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(1): 204-10.
9. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(6): 525-30.

\*De acordo com manual da FOAr/UNESP, adaptado as normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

10. Camargo MA, Roda MI, Marques MM, De Cara AA. Micro-tensile bond strength to bovine sclerotic dentine: influence of surface treatment. *J Dent.* 2008; 36(11): 922-7.
11. Carrilho M, Geraldeli S, Tay F, De Gois MF, Carvalho RM, Tjäderhane L et al. In vivo preservation of the hybrid layer by Chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007; 86(6): 529-33.
12. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjärdehane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009, 90(1): 373-80.
13. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials.* 2005; 26(9): 1035-42.
14. Carvalho RM, Manso AP, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater.* 2012; 28(1): 72-86.
15. Castanho GM, Marques MM, Marques JB, Camargo MA, Cara AA. Micromorphological and hardness analyses of human and bovine sclerotic dentin: a comparative study. *Braz Oral Res.* 2011; 25(3): 274-9.
16. Chapman JE, Tzaphlidou M, Meek KM, Kadler KE. The collagen fibril- a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc Ver.* 1990; 3(1): 143-82.
17. Chaussain- Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006; 85(1): 22-32.
18. Chee B, Rickman L, Satterwaite JD. Adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions: a systematic review. *J Dent.* 2012; 40(6): 443-52.
19. Chiba A, Zhou J, Nakajima M, Tan J, Tagami J, Scheffel DLS, et al. The effects of ethanol on the size exclusion characteristics of type I dentin collagen to adhesive resin monomers. *Acta Biomater.* 2016; 33:235- 41.

20. Davidson CL, de Gee AJ, Feilzer A. The competition between the composite-dentin bond strength and the polymerization contraction stress. *J Dent Res.* 1984; 63(12): 1396-9.
21. Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 1983; 28(2): 185-7.
22. Demarco FF, Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater.* 2012; 28(1): 87-101.
23. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four Year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 136-40.
24. De Vito Moraes AG, Francci C, Vidal CMP, Scaffa PMC, Nesadal D, Yamasaki LC, et al. Phosphoric acid concentration affects dentinal MMPs activity. *J Dent.* 2016; 53:30-7.
25. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(4): 331-49.
26. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci.* 2007; 112(2): 171-6.
27. Ferrari M, Tay FR. Technique sensitivity in bonding to vital, acid- etched dentin. *Oper Dent.* 2003; 28(1):3-8.
28. Fonovic M, Turk B. Cysteine cathepsins and their potential in clinical therapy and biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl.* 2014; 8(5-6): 416-26.
29. Fonseca RB, Haiter- Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MAC, Puppini-Rontani RM, et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(11): 1023-29.

30. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GAS, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(11): 919-22.
31. Franciscone LF, Honório HM, Rios D, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA. Effect of erosive pH cycling on different restorative materials enamel restored with these materials. *Oper Dent.* 2008; 33(2): 203-8.
32. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability- A literature review. *Dent Mater.* 2016; 32(2): 41-53.
33. Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, Nikamhlaobh R, Risteli J, Borel O, et al. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(5): 859-67.
34. Gómez-Guillén MC, Turnay J, Fernández Diaz MD, Ulmo N, Lizarbe MA, Montero P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloid.* 2002; 16(1): 25-34.
35. Gordan VV, Riley JL, Geraldeli S, Rindal DB, Qvist V, Fellows JL, et al. Repair or replacement of defective restorations by dentists in The Dental Practice-Based Research Network. *J Am Dent Assoc.* 2012; 143(6): 593-601.
36. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007; 65(1):1-13.
37. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res.* 2003; 37(5): 339-44.

38. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin- dentin bonds in human over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000; 79(6): 1385-91.
39. Hass V, Dobrovolski M, Zander-Grande C, Martins GC, Gordillo LA, Rodrigues Accorinte M de L, et al. Correlation between degree of conversion, resin- dentin bond strength and nanoleakage of simplified etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2013; 29(9):921-8.
40. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L , Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84(8): 741-6.
41. Helvatjouglu-Antoniades M, Koliniotou-Kubia E, Dionyssopoulos P. The effect of thermal cycling on the bovine dentine shear bond strength of current adhesive systems. *J Oral Rehab.* 2004; 31(9): 911-7.
42. Hu L, Xiao YH, Fang M, Gao Y, Huang L, Jia AQ, et al. Effects of type I collagen degradation on the durability of three adhesive systems in the early phase of dentin bonding. *PloS One.* 2015; 10(2): 1-12.
43. Ikemura K, Tay FR, Hironaka T, Endo T, Pashley DH. Bonding mechanism and ultrastructural interfacial analysis of a single-step adhesive to dentin. *Dent Mater.* 2003; 19(8): 707-15.
44. Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsins K cleaves native type I and II collagens at the N- terminal end of the triple helix. *Biochem J.* 1998; 1; 331(Pt3): 727-32.
45. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral.* 3 ed. São Paulo: Guanabara; 2012.
46. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* 2011; 45(5): 429-34.

47. Kohei O. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *J Biochem.* 2012; 151(1):13–25.
48. Kukacka J, Prusa R, Kotaska K, Pelouch V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Papers.* 2005; 149(2): 225-36.
49. Larger AH, Hamberg K, Pääkkönen V, Tjäderhane L, Ericson D. Collagen degradation and preservation of MMP 8 activity in human dentine matrix after demineralization. *Arch Oral Biol.* 2016; 68: 66-72.
50. Li Y, Carrera C, Chen R, Li J, Chen Y, Lenton P, et al. Fatigue failure of dentin–composite disks subjected to cyclic diametral compression. *Dent Mater.* 2015; 31(7): 778-88.
51. Li Y, Carrera C, Chen R, Li J, Lenton P, Rudney JD, et al. Degradation in the dentin- composite interface subjected to multi-species biofilm challenges. *Acta Biomater.* 2014; 10(1): 375-83.
52. Li Z, Yasuda Y, Li W, Bogoyo M, Katz N, Gordon RE, et al. Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 2004; 279(7): 5470-9.
53. Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec.* 1989; 224(2): 154-66.
54. Lippert F, Lynch RJM. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(7): 704-10.
55. Liu KZ, Hynes A, Man A, Alsagheer A, Singer DL, Scott DA. Increased local matrix metalloproteinase-8 expression in the perio- dental connective tissues of smokers with periodontal disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1762(2): 775-80.

56. Lopes MB, Consani S, Gonini Junior A, Moura SK, McCabe JF. Comparison of microleakage in human and bovine substrates using confocal microscopy. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2009; 50(3): 111-6.
57. Lopes MB, Yan Z, Consani S, Junior Gonini A, Aleixo A, McCabe JF. Evaluation of the coefficient of thermal expansion of human and bovine dentin by thermomechanical analysis. *Braz Dent J.* 2012; 23(1):3-7.
58. Marchesi G, Frassetto A, Visintini E, Diolosa M, Turco G, Salgarello S, et al. Influence of ageing on self etch adhesives: one-step vs two- step systems. *Eur J Oral Sci.* 2013; 121(1):43-9.
59. Marshall Jr. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int.* 1993; 24(9): 606-17.
60. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res.* 2012; 91(5): 467-72.
61. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006; 27(25): 4470-6.
62. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri Jr A, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI- SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 88(3): 697-703.
63. Mellberg JR. Hard- tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.* 1992; 71 Spec N°: 913-9.
64. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16(3): 265-73.

65. Nakabayashi N, Watanabe A, Arao T. A tensile test to facilitate identification of defects in dentine bonded specimens. *J Dent*. 1998; 26(4): 379-85.
66. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006; 69(3): 562-73.
67. Nemeth JA, Yousif R, Hersog M, Che M, Upadyhyay J, Shekarriz B, et al. Matrix metalloproteinase activity, bone turnover, and tumor proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Nat Cancer Inst*. 2002; 94(1): 17-25.
68. Novais VR, Soares PB, Guimarães CM, Schliebe LR, Braga SS, Soares CJ. Effect of gamma radiation and endodontic treatment on mechanical properties of human and bovine root dentin. *J Dent Braz*. 2016; 27(6): 670-4.
69. Oliveira SS, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky SA, Wilson RS, Marshall Jr GW. The effect of a self-etching primer on the continuous demineralization of dentin. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(4): 376-83.
70. Orsini G, Legitimo A, Failli A, Massei F, Biver P, Consolini R. Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *Int Immunol*. 2012; 24(6): 347-56.
71. Orsini G, Ruggeri A Jr, Mazzoni A, Papa V, Piccirilli M, Falconi M, et al. Immunohistochemical identification of type I and III collagen and chondroitin sulphate in human pre- dentine: a correlative FEI-SEM/TEM study. *Int Endod J*. 2007; 40(9): 669-78.
72. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011; 27(1): 1-16.
73. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host- derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004; 83(3): 216-21.



74. Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding conditions. *J Dent*. 1999; 27(3):209-14.
75. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: A comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013; 25(4): 219-41.
76. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater*. 2005; 21(9): 864-81.
77. Prylinska- Czyzewska A, Piotrowski P, Prylinski M, Dorocka- Bobkowska B. Various cements and their effects on bond strength of zirconia ceramic to enamel and dentin. *Int J Prosthodont*. 2015; 28(3): 279-81.
78. Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SRP. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine and porcine teeth. *J Adhes Dent*. 2004; 6(2): 117-21.
79. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci*. 2010; 118(4): 411-6.
80. Rueggeberg FA. Substrate for adhesion testing to tooth structure- review of the literature. *Dent Mater*. 1991; 7(1): 2-10.
81. Rüttermann S, Braun A, Janda R. Shear bond strength and fracture analysis of human vs. bovine teeth. *PloS One*. 2013; 8(3): 1-6.
82. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res*. 2008; 84(1): 19-29.
83. Sato M, Miyazaki M. Comparison of depth of dentin etching and resin infiltration with single-step adhesives systems. *J Dent*. 2005; 33(6): 475-84.

84. Sauro S, Pashley DH, Mannocci F, Tay FR, Pilecki P, Sheriff M, et al. Micropermeability of current self-etching and etch-and-rinse adhesives bonded to deep dentine: a comparison study using a double staining/ confocal microscopy technique. *Eur J Sci Oral*. 2008; 116(2): 184-93.
85. Scaffa PM, Breschi L, Mazzoni A, Vidal CM, Curci R, Apolonio F, et al. Co-distribution of cysteine cathepsins and matrix metalloproteases in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2017; 74: 101-7.
86. Scheffel DL, Huck C, Soares DG, Basso FG, de Souza Costa CA, Brackett MG, et al. Uninfiltrated collagen in hybrid layers produced after reduced acid-etching time on primary and permanent dentin. *J Contemp Dent Pract*. 2016; 17(10): 861-6.
87. Schilke R, Lisson JA, Baub O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(5): 355-61.
88. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LI, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod*. 2001; 27(1): 23-30.
89. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover. Part I: Biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*. 2005; 26:97-122.
90. Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Vallittu P, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent Mater*. 2015; 31(8): 941-7.
91. Shin TP, Yao X, Huenergardt R, Walker MP, Wang Y. Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dent Mater*. 2009; 25(8): 1050-7.
92. Skene L. Ownership of human tissue and the law. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(2):145-8.

93. Soares FZM, Follak A, da Rosa LS, Montagner AF, Lenzi TL, Rocha RO. Bovine tooth is substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta- analysis of in vitro studies. *Dent Mater.* 2016; 32(11): 1385-93.
94. Soares LES, Campos ADF, Martin AA. Human and bovine dentin composition and its hybridization mechanism assessed by FT- Raman spectroscopy. *J Spectrosc.* 2013; 2013: ID 210671.
95. Soares LES, Santo AME. Morphological and chemical comparative analysis of the human and bovine dentin- adhesive layer. *Microsc Microanal.* 2015; 21(1): 204-13.
96. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62(3): 447-56.
97. Spencer P, Wang Y, Katz JL. Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2004; 6(2): 91-5.
98. Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Marangos O, Wang Y, et al. Adhesive/dentin interface: the weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010; 38(6): 1989-2003.
99. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002; 81(9): 603-7.
100. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(2): 121-7.
101. Takano Y, Sakai H, Baba O, Terashima T. Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum. *Bone.* 2000; 26(4): 333-9.
102. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc.* 2003; 69(11): 726-31.

103. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MR, Hur YB, Garret LV, et al. Bonding BisGMA to dentin- a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86(11): 1034-9.
104. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010; 36(3): 475-81.
105. Teruel JD, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(5): 768-75.
106. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjäderhane L, et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dent Mater.* 2010; 26(11): 1059- 67.
107. Tjäderhane L, Buzalaf MAR, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: the era of “dentin degradomics”. *Caries Res.* 2015; 49(3):193-208.
108. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endod Topics.* 2012; 20(1): 3–29.
109. Tjäderhane L. Dentin bonding: can we make it last? *Oper Dent.* 2015; 40(1): 4-18.
110. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinase in dentin matrix during breakdown in carious lesions. *J Dent Res.* 1998; 77(8): 1622-9.
111. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer- a review. *Dent Mater.* 2013; 29(10): 999-1011.
112. Turco G, Frassetto A, Fontanive L, Mazzoni A, Cadenaro M, Di Lenarda R, et al. Occlusal loading and cross-linking effects on dentin collagen degradation in physiological conditions. *Dent Mater.* 2016; 32(2): 192-9.

113. Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Braz Dent J.* 2010; 21(4): 332-6.
114. Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, et al. Relationship between bond- strength tests and clinical outcomes. *Dent Mat.* 2010; 26(2): 100-21.
115. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827-39.
116. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res.* 2003; 82(2): 141-5.
117. Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil.* 2008; 35(5): 390-4.
118. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011; 53(3): 273-82.
119. Young- Laurance P, Bozec L, Gracia L, Rees G, Lippert F, Lynch RJM, et al. A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behavior in relation to erosive challenge and remineralization. *J Dent.* 2011; 39(4): 266- 72.
120. Zaitseva OV, Shandrenko SB, Veliky MM. Biochemmical markers of bone collagen Type I metabolism. *Ukr Biochem J.* 2015; 87(1): 21-32.
121. Zhang S-C, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009; 1(4): 163-76.